

苏芳花花色素体外抗氧化性及抑菌性研究

杨晓玲¹, 郭彦东²

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 普渡大学 西拉法叶城校区, 美国印第安纳州 西拉法叶 47906)

摘要: 从苏芳花鲜花瓣提取分离花色素, 研究其在体外的抗氧化性和抑菌性。结果表明: 苏芳花花色素具有较强的还原性, 能有效清除系统中的超氧阴离子和羟基自由基, 且清除效果与色素浓度正相关。在苏芳花花色素浓度为 0.48 mg/mL 时, 其还原力与 0.1 mg/mL VC 相当, 而对超氧阴离子和羟基自由基的清除率则可分别达到 59.3% 和 96.1%。苏芳花花色素能够显著抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的生长。在色素浓度为 0.48 mg/mL 时, 对 3 种菌的抑菌圈直径分别为 9.46 mm、9.36 mm 和 8.14 mm。苏芳花花色素具有较强的抗氧化性和抑菌性。

关键词: 苏芳花; 花色素; 抗氧化性; 抑菌性

中图分类号: Q 946 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)06-0667-05

The Antioxidant Activity and Antibacterial Activity of Pigment from *Cercis chinensis* in Vitro

YANG Xiao-ling¹, GUO Yan-dong²

(1. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. Purdue University, West Lafayette 47906, USA)

Abstract: The objective of this manuscript is to measure and analysis the antioxidant and antibacterial activity of the pigment which is extracted from the flower of *Cercis chinensis*. A sequence of experiments was conducted to measure the above parameters, such as spectrophotometry and inhibiting bacteria circle diameter measure. The results demonstrate that the pigment has strong reduction and is able to effectively scavenge hydroxyl radical and superanion radical in vitro. Moreover, its scavenging effect has positive correlation with its concentration. When the pigment concentration is 0.48 mg/mL, the reducing power is identical to that of 0.1 mg/mL VC, and the hydroxyl radical and superanion radical eradication rates are 59.3% and 96.1%, respectively. At the same concentration, the pigment has significant concentration-dependent inhibitory effect against *E. coli* and *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. Diameters of inhibiting bacteria circle of the above three kinds of bacteria are 9.46 mm, 9.36 mm, 8.14 mm, respectively. From the aboved results, it can concluded that the pigment has strong antioxidant and antibacterial activity.

Key words: *Cercis chinensis*, pigment, antioxidantation, antibacterial

收稿日期: 2011-08-20

基金项目: 淮海工学院自然科学基金项目(Z2010036)

作者简介: 杨晓玲(1955-), 女, 山西平遥人, 教授, 主要从事植物资源方面的研究。E-mail: gjyao6688@yahoo.com.cn

近年来,随着人类对健康生活品质要求的提高,植物源天然食用色素的开发和应用越来越受到人们的重视,逐渐成为世界食用色素发展的总趋势^[1-2]。花色素因其美丽的颜色和天然、无毒而特别适宜用作食品添加剂。目前已广泛应用于果酱、腌制品、果冻、冰淇淋和糖果等食品中。因其多方面的生理功能而在保健品开发领域具有巨大潜力。有研究表明:花色苷色素对人类许多疾病都可以起到预防和治疗作用^[3]。Alessandra 等在意大利人群中对比花色苷的摄入和急性心肌梗死之间的调查发现花色苷的大量摄入可以降低酒后发生急性心肌梗死的危险性^[4]。吕春茂^[5]等对越橘果实花色苷的抗氧化性研究表明,该色素对羟基自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基均有良好的清除作用。孙希云^[6]等对红树莓花色苷粗提物研究表明,该粗提物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有较好的抑制作用,对酿酒酵母抑制性较弱,对根霉和黑曲霉无抑制性。本实验对苏芳花花色素的还原力、抗氧化性和抑菌性等功能进行了研究,希望为苏芳花花色素的开发利用提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

苏芳花(*Cercis chinensis* Bunge)为豆科(*Leguminosae*)落叶乔木,俗称满条红,含有多种活性成分。苏芳花鲜花,2011年采于淮海工学院校园内。

大肠杆菌(*E. coli*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),均接种于淮海工学院食品工程学院微生物实验室。

1.2 实验方法

1.2.1 苏芳花花色素的提取分离 称取新鲜苏芳花花瓣 80 g,加少量体积分数 1% 酸化乙醇(体积比)研磨成糊状,再加 2 倍量的体积分数 1% 酸化乙醇搅拌浸提,然后经单层滤纸过滤至 100 mL 容量瓶中。滤渣再反复浸提 2~3 次,合并滤液,定容至 100 mL,即为苏芳花花色素提取液。

将苏芳花花色素提取液减压干燥,去除酸化乙醇,加入少量蒸馏水溶解,再加入质量分数 5% 醋酸铅(质量比)适量混匀,抽滤去除滤液,收集沉

淀。将沉淀转移至烧杯中,加入体积分数 8% 酸化水,过滤去除沉淀,收集滤液。将此溶液干燥浓缩后,用 pH 值为 2 的水定容在 200 mL 容量瓶中,即为本实验所用的苏芳花花色素原液,置于暗处低温保存。色素溶液的质量浓度为 0.8 mg/mL。

分别取苏芳花花色素原液 20、40、60 mL,用 pH 值为 2 的水稀释至 100 mL,顺次分别标记为色素 1,色素 2,色素 3,原液标记为色素 4。以下实验中选用色素均用该代号代替。

1.2.2 苏芳花花色素吸收光谱的测定 取少量色素 3 溶液,以 pH2 的水作对照,在紫外-可见分光光度计测量 460~600 nm 范围内的吸收光谱,并找出最大吸收波长 $\lambda_{\max}(\text{nm})$ 。

1.2.3 苏芳花花色素还原力及对超氧阴离子与羟基自由基清除率的测定 参考文献^[5]进行。苏芳花花色素的还原力采用铁氰化钾还原法测定溶液吸光度的变化。苏芳花花色素对超氧阴离子的清除作用,用邻苯三酚氧化法测定,然后计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = ((\Delta A_0 - \Delta A) \times 100) / \Delta A_0$$

式中: ΔA_0 为邻苯三酚自氧化速率; ΔA 为加入色素提取液后邻苯三酚的氧化速率,单位均为吸光度每分钟的增值。

苏芳花花色素对羟基自由基的清除作用,以 H_2O_2 为氧化剂,以 Fe-SO_4 为催化体系,测定提取液对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力,然后计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = ([A_0 - (A_1 - A_2)] \times 100) / A_0$$

式中: A_0 为对照液的吸光度; A_1 为加入花色苷溶液后的吸光度; A_2 为不加显色剂 H_2O_2 花色苷溶液的吸光度。

1.2.4 苏芳花花色素抑菌作用实验 用无菌生理盐水将各种活化过的菌配制成菌悬液,并通过血球计数板对菌悬液进行计数,最终配成菌悬液浓度约为 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL。在牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基上分别接种大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌菌悬液各 1 mL,用涂布棒将菌液涂布均匀。

取直径 6 mm 的圆形无菌滤纸片,分别用 pH2 的水、色素 1、色素 2 和色素 3 进行浸泡 30 min,使小滤纸片吸收足够量的色素溶液。再将滤纸片平贴在接有大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的固体培养基上。每个培养皿中贴 4 片相同色

素浓度的滤纸片和1片浸泡在pH2的水中的滤纸片,重复2次。37℃培养24h后,测定培养基中每个滤纸片周围抑菌圈直径大小,取平行实验中抑菌圈直径的平均值,确定其抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 苏芳花花色素的吸收光谱用紫外-可见分光光度计在460~600 nm区间测定色素3的吸光度,每次调整波长时以5 nm为间隔,初步测出苏芳花花色素吸收波峰时,再以2 nm为间隔,测量色素在吸收峰周围6 nm范围内的吸光度。结果如图1。

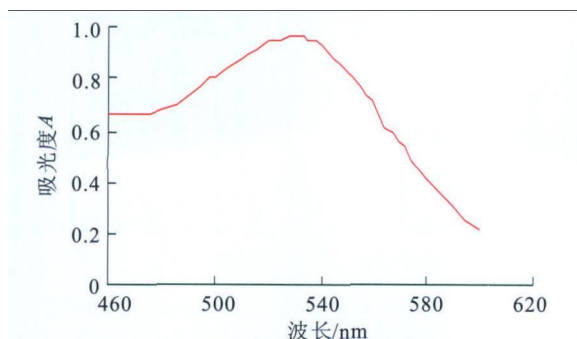


图1 苏芳花花色素吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum curves of pigment

由图1可知,苏芳花花色素在460~600nm区间存在1个吸收峰,最大吸收波长为530nm,符合花色苷类色素的吸收光谱特征。

2.2 苏芳花花色素与VC溶液还原能力的比较

取0.1 mg/mL的VC溶液,与色素1,色素2,色素3,色素4做还原能力的比较。实验结果如图2所示。

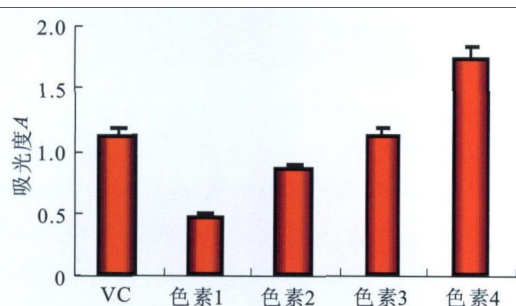


图2 苏芳花花色素还原能力比较

Fig. 2 Comparison of reducing power

由图2可知,苏芳花花色素1吸光度为0.472,色素2吸光度为0.847,均小于VC溶液吸光度1.112,说明这两种浓度色素还原能力低于该VC溶液;色素3吸光度为1.129,与该VC溶液吸光度相差不大,说明还原能力也与该VC溶液接近;而色素

4吸光度为1.750,远高于该VC溶液,说明色素4还原能力强于该VC溶液。可见,在该反应体系中,苏芳花花色素可以提供电子,将三价铁离子还原成二价铁离子。说明苏芳花花色素具有较强的还原力。苏芳花花色素的还原力随着色素浓度的增加而提高,具有直线相关性。色素还原力与浓度的关系为: $Y=0.4116X+0.0205$,相关系数 $R^2=0.9719$ 。

2.3 苏芳花花色素对超氧阴离子的清除作用

取色素1,色素2和色素3进行苏芳花花色素对超氧阴离子清除作用的实验,结果如图3所示。

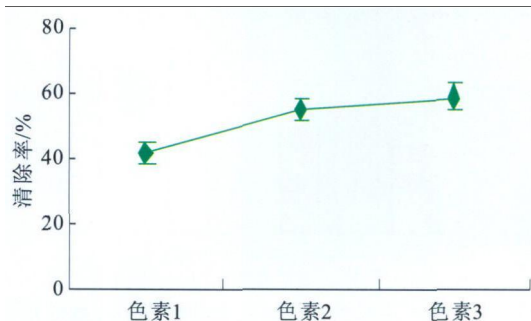


图3 苏芳花花色素对超氧阴离子的清除

Fig. 3 Clearance of the pigment to superoxide anion radical

图3显示,苏芳花花色素1、色素2、色素3对超氧阴离子的清除率分别为41.32%、55.37%、59.32%。说明苏芳花花色素具有清除超氧阴离子的作用,对超氧阴离子的清除能力随着苏芳花花色素浓度的提高而提高。苏芳花花色素浓度与对超氧阴离子清除率的关系为: $Y=9X+34.003$,相关系数 $R^2=0.905$ 。苏芳花花色素能有效清除超氧阴离子。

2.4 苏芳花花色素对羟基自由基的清除作用

用色素1,色素2,色素3进行色素的清除羟基自由基的实验。实验结果如图4所示。

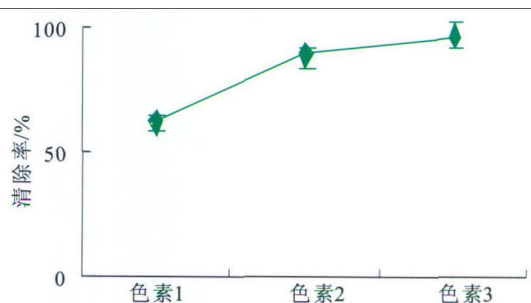


图4 苏芳花花色素对羟基自由基的清除

Fig. 4 Clearance of the pigment to hydroxyl radical

由图4可知,不同浓度的苏芳花花色素对羟基自由基的清除作用不同。苏芳花花色素1、色素2、

色素 3 对羟基自由基的清除率分别为 61.3%、87.8%、96.1%。说明,苏芳花花色素的浓度与对羟基自由基的清除率成正相关: $Y = 17.4X + 46.933$, 相关系数 $R^2 = 0.9164$ 。苏芳花花色素清除羟基自由基的作用较强。

2.5 苏芳花花色素的抑菌性

2.5.1 苏芳花花色素对大肠杆菌的抑制性 取出实验培养皿,测量分析大肠杆菌培养基中苏芳花花色素的抑菌圈大小,结果如图 5 所示。

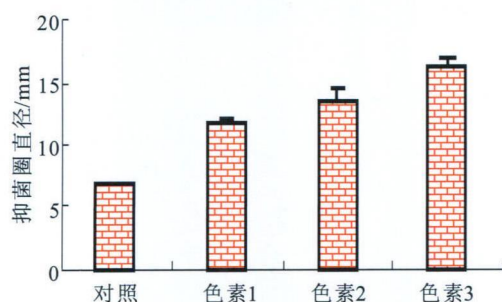


图 5 苏芳花花色素对大肠杆菌的抑制

Fig. 5 Inhibitory action of pigment to *E. coli*

由图 5 可知,由于对照采用 pH2 的水处理滤纸片,使对照出现了直径为 6.67mm 的抑菌圈,所以应从苏芳花花色素的抑菌圈直径中扣除对照的抑菌圈直径才能反映实际的抑菌效果。这样,苏芳花花色素 1、色素 2、色素 3 的实际抑菌圈分别为 5.08、7.08、9.46 mm。表明 3 种浓度的苏芳花花色素对大肠杆菌生长都具有显著抑制作用,且随着苏芳花花色素浓度的增加抑菌效果增强。苏芳花花色素浓度与对大肠杆菌抑菌性的关系为: $Y = 2.19X + 9.4967$, 相关系数 $R^2 = 0.9975$ 。

2.5.2 苏芳花花色素对金黄色葡萄球菌的抑制性

不同浓度的苏芳花花色素对金黄色葡萄球菌生长的抑制作用如图 6 所示。

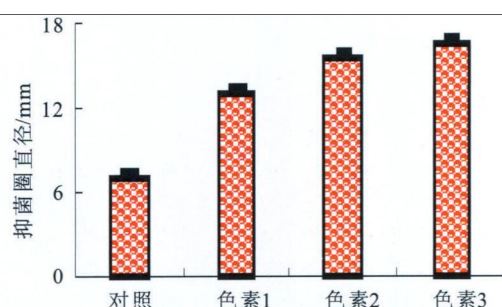


图 6 苏芳花花色素对金黄色葡萄球菌的抑制作用

Fig. 6 Inhibitory action of pigment to *Staphylococcus aureus*

由图 6 可知,扣除对照的作用,苏芳花花色素 1、色素 2、色素 3 对金黄色葡萄球菌的实际抑菌圈分别为 5.86、8.24、9.36 mm。表明 3 种浓度的苏芳花花色素对金黄色葡萄球菌生长都具有显著抑制作用,且随着苏芳花花色素浓度的增加抑菌效果增强。苏芳花花色素浓度与对金黄色葡萄球菌抑菌性的关系为: $Y = 1.75X + 11.21$, 相关系数 $R^2 = 0.9586$ 。

2.5.3 苏芳花花色素对枯草芽孢杆菌的抑制性

对枯草芽孢杆菌的抑菌实验结果如图 7 所示。

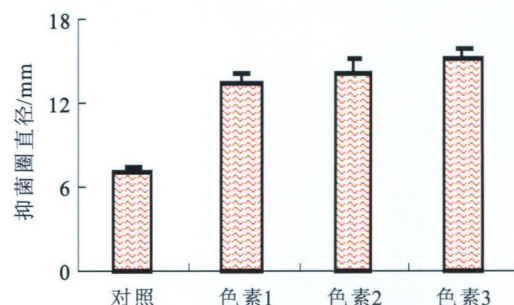


图 7 苏芳花花色素对枯草芽孢杆菌的抑制作用

Fig. 7 Inhibitory action of pigment to *Bacillus subtilis*

由图 7 可知,减去对照的作用,苏芳花花色素 1、色素 2、色素 3 对枯草芽孢杆菌的实际抑菌圈分别为 6.26、7.26、8.14 mm。表明 3 种浓度的苏芳花花色素对枯草芽孢杆菌生长都具有显著的抑制作用,且随着苏芳花花色素浓度的增加抑菌效果增强。苏芳花花色素浓度与对枯草芽孢杆菌抑菌性的关系为: $Y = 0.94X + 12.45$, 相关系数 $R^2 = 0.9986$ 。

3 结 语

3.1 花色素的抗氧化性

在生活细胞中,常会形成不同类型的活性氧自由基,如羟基自由基、超氧阴离子等,它们的氧化作用可使多不饱和脂肪酸氧化成脂质过氧化物,损害细胞膜;或使 DNA 损伤、变性、降解;或使蛋白质多肽链断裂,从而使细胞发生病变、衰老,导致各种疾病的发生^[3,7]。

花色素分子中有多酚羟基,能提供活泼的氢原子,可以与自由基发生抽氢反应,终止自由基链式反应;另一方面,花色素苷还可以通过螯合可作为自由基反应的催化剂的过渡金属元素来抑制脂质过氧化和其他氧化修饰反应。说明花色素可以降低氧化性细胞损伤^[8],降低氧化性 DNA 损伤,提高

还原性谷胱甘肽水平。所以,对植物花色素开发利用具有重要意义。目前,在花色素的体外抗氧化研究方面,已经获得了多种植物花色素具有抗氧化性的研究结果^[5,7,9]。本实验研究表明,从苏芳花花瓣中提取的花色素具有较高的生物活性,对体系中的羟基自由基和超氧阴离子均有较强的清除作用,且苏芳花花色素清除羟基自由基的能力比清除超氧阴离子的能力更强。

3.2 花色素的抑菌性

不同植物的花色素有不同的抑菌作用,探明具体花色素的抑菌性对其应用有重要参考价值。杨晓玲等^[10]研究证实,紫甘蓝色素对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的生长具有极显著的抑制作用,但

未见紫甘蓝色素对大肠杆菌生长有抑制效果。王关林等^[11]研究表明甘薯块根花青素对3种常见致病菌均有抑菌作用。孙希云^[6]等研究证明,红树莓花色苷粗提物对不同微生物有不同的抑制作用。在本实验中,苏芳花花色素对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均有显著抑制作用,并且抑菌圈直径与色素浓度正相关。

花色素作为食品添加剂的一种必然会在该行业中占到越来越重的地位。花色素作为保健品,也必然会得到消费者越来越多的青睐。苏芳花花色素抗氧化性与抑菌性的研究结果,为植物花色素的应用提供了新的参考。

参考文献(References):

- [1] 彭子模,李进,孟冬丽. 植物源天然色素的开发与应用研究现状与展望[J]. 新疆师范大学学报:自然科学版,2000,19(4):43-55.
PEN Zi-mo, LI Jin, MONG Dong-li. The present condition and prospect for the exploitation and application of natural plant-pigment[J]. *Journal of Xinjiang Normal University: Natural Sciences Edition*, 2000, 19(4): 43-55. (in Chinese)
- [2] 霍锋,郑瑞杰,温海霞,等. 植物源天然食用色素的开发利用研究[J]. 农业科技与装备,2008(5):44-46.
HUO Feng, ZHENG Rui-jie, WEN Hai-xia, et al. The exploitation and utilization of plant-derived natural edible pigments[J]. *Agricultural Science & Technology and Equipment*, 2008(5): 44-46. (in Chinese)
- [3] 郑永霞. 花色苷药理功效的研究进展[J]. 山西医药杂志,2008,37(3):255-257.
ZHENG Yong-xia. Anthocyanins pharmacological effect research progress[J]. *Shanxi Medical Journal*, 2008, 37(3): 255-257. (in Chinese)
- [4] Tavani A. Intake of specific flavonoids and risk of acute myocardial infarction in Italy[J]. *Public Health Nutrition*, 2006, 9(3): 369-374.
- [5] 吕春茂,王新现,包静,等. 越橘果实花色苷的体外抗氧化性[J]. 食品科学,2010,31(23):27-31.
LU Chun-mao, WANG Xin-xian, BAO Jing, et al. In vitro antioxidant evaluation of anthocyanins from bilberry fruits[J]. *Food science*, 2010, 31(23): 27-31. (in Chinese)
- [6] 孙希云,赵秀红,张琦,等. 红树莓花色苷粗提物抗氧化性能与抑菌作用研究[J]. 食品工业科技,2009,30(3):132-135.
SUN Xi-yun, ZHAO Xiu-hong, ZHANG Qi, et al. Study on the ability to antioxidant and bacteriostasis of crude extract of red raspberry anthocyanins[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2009, 30(3): 132-135. (in Chinese)
- [7] 赵桃,唐亚伟,单月琴,等. 青稞紫色素的基本性质及其抗氧化能力[J]. 食品与发酵工业,2010,36(8):68-73.
ZHAO Tao, TANG Ya-wei, SHAN Yue-qin, et al. Basic properties and antioxidant activity of purple pigment from hulless barley[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(8): 68-73. (in Chinese)
- [8] Weisel T, Baum M. An anthocyanin polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands[J]. *Biotechnol Journal*, 2006, 4(4): 388-397.
- [9] 区子弁,王丽娟,王琴,等. 紫甘薯花色苷体外清除自由基的研究[J]. 粮油加工,2010(1):110-112.
OU Zi-bian, WANG Li-juan, WANG Qin, et al. Purple sweet potato in vitro of anthocyanins free radicals[J]. *Cereals and Oils Processing*, 2010(1): 110-112. (in Chinese)
- [10] 杨晓玲,郭彦东. 紫甘蓝色素的稳定性及抑菌性[J]. 食品科学,2010,31(23):32-35.
YANG Xiao-ling, GUO Yan-dong. Stability and antibacterial activity of purple cabbage pigment[J]. *Food science*, 2010, 31(23): 32-35. (in Chinese)
- [11] 王关林,岳静,李洪艳,等. 甘薯花青素的提取及其抑菌效果分析[J]. 中国农业科学,2005,38(11):2321-2326.
WANG Guan-lin, YUE Jing, LI Hong-yan, et al. Extraction of anthocyanin from sweetpotato by macroporous resin and its bacteriostatic mechanism[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(11): 2321-2326. (in Chinese)